

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO,

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

09/403262
REC'D 28 JUL 1998
WIPO PCT

Bescheinigung**PRIORITY DOCUMENT**

Herr Dr. Nikolaus (Klaus) T h e r e s in Pulheim/
Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der
Bezeichnung

"Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung
und/oder gesteuerter Abscissionszonenbildung"

am 15. April 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue
Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patent-
anmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig die
Symbole C 12 N, C 07 H und A 01 H der Internationalen
Patentklassifikation erhalten.

München, den 5. Mai 1998
Der Präsident des Deutschen Patentamts
Im Auftrag

Anzeichen: 197 15 700.9

Wehner



Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder gesteuerter Abscissionszonenbildung

5 Beschrieben sind Nukleotidsequenzen, die Polypeptide codieren, die für die Steuerung der
Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlich sind sowie die durch die
Nukleotidsequenzen codierten Polypeptide und Aminosäuresequenzen. Beschrieben sind
10 weiterhin Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder gesteuerter Bildung von
Abscissionszonen in den Blütenstielen, wobei die für die Seitentriebbildung und/oder
Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment
oder Derivat stabil in das Genom der Pflanzenzelle oder das Pflanzengewebe integriert ist.
Beschrieben sind ferner Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit gesteuerter
15 Seitentriebbildung und/oder gesteuerter Bildung von Abscissionszonen in den Blütenstielen,
wobei die für die Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche
exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat stabil in das Genom von
Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe integriert werden und die erhaltenen Pflanzenzellen oder
Pflanzengewebe zu Pflanzen regeneriert werden. Darüberhinaus sind Pflanzen sowie das
Saatgut von Pflanzen beschrieben, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich sind.

Belegexemplar
Darf nicht geändert werden

Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder gesteuerter Abscissionszonenbildung

Die Erfindung betrifft Nukleotidsequenzen, die Polypeptide codieren, die für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlich sind, sowie die durch die Nukleotidsequenzen codierten Polypeptide und Aminosäuresequenzen. Die Erfindung betrifft weiterhin Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder gesteuerter Bildung von Abscissionszonen in den Blütenstielen, wobei die für die Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat stabil in das Genom der Pflanzenzelle oder das Pflanzengewebe integriert ist. Die Erfindung betrifft ferner Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder gesteuerter Bildung von Abscissionszonen in den Blütenstielen, wobei die für die Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat stabil in das Genom von Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe integriert wird und die erhaltenen Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe zu Pflanzen regeneriert werden. Darüberhinaus betrifft die Erfindung Pflanzen sowie das Saatgut von Pflanzen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich sind.

Technischer Hintergrund

Die Leistungseigenschaften von Nutz- und Zierpflanzen werden maßgeblich durch ihre Architektur bestimmt. Während sich der Grundbauplan einer Pflanze in der Embryonalentwicklung manifestiert, ist die postembryonale Phase durch die Aktivität der Apikalmeristeme gekennzeichnet. Von zentraler Bedeutung ist dabei die Fähigkeit des Sproßapikalmeristems (SAM) höherer Pflanzen, Verzweigungen des Sprosses zu initiieren und deren Entwicklung zu steuern. So wird der Habitus einer Pflanze und damit ein wesentliches Leistungsmerkmal geprägt durch Zahl, Anordnung und Entwicklungsintensität ihrer Seitentriebe. Die Verzweigung des Sprosses kann sowohl terminal als auch lateral erfolgen. Die terminale Verzweigung, bei der sich das SAM in zwei Teile aufspaltet, tritt vor allem bei

5
niederen Kormophyten auf und ist nur für wenige Blütenpflanzen beschrieben worden (Steeves und Sussex, 1989, Patterns in Plant Development, 2. Auflage, Cambridge University Press, Cambridge). Die für Blütenpflanzen typische laterale Verzweigung beruht auf der Entstehung neuer Sproßapikalmeristeme in den Blattachsen. Diese gehen auf Zellen des SAM zurück, deren meristematischer Charakter im Gegensatz zu den sie umgebenden Zellen, die an der Entwicklung der Blattprimordien beteiligt sind, erhalten bleibt. Im weiteren Entwicklungsverlauf bildet sich aus diesen Restmeristemen eine Seitenknospe, die neben einigen Blattprimordien ein Apikalmeristem enthält, dessen Aktivität jedoch der Kontrolle durch das SAM des Hauptsprosses unterliegt.

10 Die Analyse von Pflanzenmutanten ergab, daß die Verzweigung des Sproßsystems von genetischen Faktoren gesteuert wird. So ist zum Beispiel bei der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) eine Reihe von Mutanten beschrieben worden, deren Seitentriebbildung auf unterschiedlichen Stadien gehemmt ist (z.B. *blind*, *blind-2*, *torosa*, *lateral suppressor*). Eine morphologische Charakterisierung zeigte, daß bei den Tomatenmutanten *blind*, *blind-2* und *torosa* das Austreiben der Achselknospen gestört ist (Tucker, 1979, Ann. Bot. 43:571-577; Mapelli und Lombardi, 1982, Plant & Cell Physiol. 23:751-757). Dagegen unterbleibt bei Pflanzen, die homozygot für die rezessive *lateral suppressor* (*ls*) Mutation sind, bereits die Anlage der meisten Seitenknospen (Brown, 1955, Rep. Tomato Genetics Cooperative, 5:6-7).
15 Eine histologische Analyse (Malayer und Guard, 1964, Amer. Jour. Bot., 51:140-143) zeigt, daß direkt vom SAM abstammende Zellen in den Achseln der Blattprimordien, auf deren meristematischer Aktivität die Entstehung der Seitenknospen beruht, in der *lateral suppressor*-Mutante fehlen. Würde ein Fehlen von Seitentrieben in allen Blattachsen zu einer Termination der Sproßachse in der ersten Infloreszenz führen, so zeigt sich mit dem Übergang zur floralen Entwicklung, daß die Fähigkeit zur Anlage von Achselmeristemen in der Mutante nicht vollständig verloren ist. In der Achsel des unmittelbar vor der Infloreszenz angelegten Blattprimordiums wird auch in homozygoten *ls*-Mutanten häufig ein Meristem angelegt. Die Anlage dieses für den sympodialen Aufbau der Sproßachse notwendigen Meristems wird oft von der Entstehung einer Seitenknospe in der Achsel des nächstälteren Blattes begleitet. Nach dem Übergang in die florale Phase ist die Entwicklung der *ls*-Mutante durch eine geringere Anzahl von Blüten pro Infloreszenz (Williams, 1960, Heredity, 14:285-296), die fehlende Anlage von Petalenprimordien (Szymkowiak und Sussex, 1993, Plant J., 4:1-7) und eine aberrante Zahl von Stamina und Karpellen (Groot *et al.*, 1994, Sci. Hort., 59:157-162) gekennzeichnet. Weiterhin wird bei der Mutante eine reduzierte Fertilität beobachtet, was auch
30 eine Reduktion des Ertrages zur Folge hat und der Grund dafür ist, daß die *ls*-Mutante für den
35

Ertragsanbau keine Bedeutung erlangte.



Eine weitere phänotypische Veränderung der *ls*-Mutante betrifft die Ausbildung von Abscissionszonen in den Blüten- und Fruchtsielen. Während Wildtyppflanzen einen Bereich von 5-10 Lagen von kleineren Zellen besitzen, an dessen distalem Ende die nicht befruchtete Blüte bzw. die reife Frucht sich von der Pflanze löst (Roberts et al. 1984, *Planta*, 160: 159-163), wird diese Abscissionszone in der *ls*-Mutante nicht ausgebildet und die Frucht löst sich bei der Ernte ohne Reste des Fruchtsiels und der Kelchblätter von der Pflanze.

Die beobachteten phänotypischen Veränderungen sind auf physiologischer Ebene mit Störungen in den Gleichgewichten bestimmter Pflanzenhormone korreliert. Im Vergleich zum Wildtyp wurden in den Sproßspitzen von *ls*-Mutanten niedrigere Cytokininkonzentrationen gemessen (Maldiney et al., 1986, *Physiol. Plant*, 68:426-430; Sossountzov et al., 1988, *Planta*, 175:291-304), während die Mengen β -Indolylessigsäure (IAA)-ähnlicher Verbindungen sowie Gibberellin- und Abscisinsäure deutlich erhöht sind (Tucker, 1976, *New Phytol.*, 77:561-568). Versuche, die Defekte der *ls*-Mutante durch Einführung eines Isopentenyltransferase-Gens aus *Agrobacterium tumefaciens* zu beheben, führten zwar zu einer Erhöhung der endogenen Cytokininkonzentrationen, aber nicht zu einer Normalisierung der Seitentriebentwicklung (Groot et al., 1995, *Plant Growth Regulation*, 16:27-36).

Aufgrund des großen Interesses der Züchter an einstämmigen Tomatensorten gab es schon frühzeitig Bestrebungen, die *ls*-Mutante für den gewerblichen Anbau nutzbar zu machen. Da die DNA-Sequenz des für die Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlichen Gens (*Ls*-Gen) bisher nicht bekannt war, wurde wiederholt versucht, auf genetischem Wege die erwünschten Effekte auf die Seitentriebbildung von den unerwünschten Effekten auf Fertilität und Ertrag zu trennen. Alle diese Bemühungen führten bis jetzt jedoch nicht zum Erfolg.

Zur Isolierung von Genen, die nur durch einen mutanten Phänotyp und ihre Position auf der genetischen Karte charakterisiert sind, wurden in den letzten Jahren bevorzugt die Strategien der Insertionsmutagenese und der positionellen Klonierung verwendet. Die Insertionsmutagenese nutzt durch Insertion einer bekannten Sequenz erzeugte mutante Allele zur Isolierung der auf diese Weise molekular markierten Gene. Bei Pflanzen wurden sowohl die T-DNA von *Agrobacterium tumefaciens* (Koncz et al., 1992, *Plant Mol. Biol.*, 20:963-976) als auch transponierbare Elemente (Gierl und Saedler, 1992, *Plant Mol. Biol.*, 19: 39-49)

zur Insertionsmutagenese eingesetzt (Jones *et al.*, 1994, *Science* 266:789-793). Da die transponierbaren Elemente *Ac* und *Ds* aus Mais präferentiell an gekoppelte Positionen auf dem gleichen Chromosom transponieren (Knapp *et al.*, 1994, *Mol. Gen. Genet.*, 243:666-673), ist eine Transposonmutagenese dann besonders aussichtsreich, wenn eine Ausgangslinie zur Verfügung steht, in der das transponierbare Element in enger Kopplung zu dem gesuchten Gen vorliegt. Da eine solche Tomatenlinie nicht zur Verfügung steht, ist eine Transposonmutagenese zur Isolierung des *Ls*-Gens wenig aussichtsreich.

Die Strategie der positionellen Klonierung wurde zur Analyse der molekularen Grundlagen von Erbkrankheiten in Säugetieren entwickelt und u.a. für die Isolierung der menschlichen Gene für Duchenne Muskeldystrophie (Koenig *et al.*, 1987, *Cell*, 50:509-517), Cystische Fibrose (Rommens *et al.*, 1989, *Science*, 245:1059-1065) und Chorea-Huntington (Huntington's Disease Research Group, 1993, *Cell*, 72:971-983) eingesetzt. In Zeichnung 1 ist der Ablauf einer positionellen Klonierung schematisch dargestellt. Von zentraler Bedeutung für diese Strategie ist die Integration des klassischen genetischen Locus in eine Karte molekularer Marker. Der Einsatz von Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismen (RFLP) als genetische Marker (Botstein *et al.*, 1980, *Am. J. Hum. Genet.*, 32:314-331) ermöglicht die Identifizierung enggekoppelter DNA-Fragmente aus der Umgebung des zu isolierenden Gens. Diese Fragmente dienen anschließend als Hybridisierungs sonden in der Southern-Analyse mittels Pulsfeldgelelektrophorese (Chu *et al.*, 1986, *Science*, 234:1582-1585) aufgetrennter hochmolekularer DNA, um den relativen genetischen Abstand in einen absoluten Wert für den physikalischen Abstand zu übersetzen, der durch den sogenannten "chromosome walk" zu überbrücken ist. Ausgehend von den flankierenden Markern als Startpunkte wird die Umgebung des gesuchten Gens in Form überlappender DNA-Fragmente isoliert. Je nach Distanz der flankierenden Marker in der genetischen Karte handelt es sich bei den DNA-Fragmenten um YAC- oder Cosmid-Klone (Burke *et al.*, 1987, *Science*, 236:806-812). RFLP-Karten hoher Markerdichte sind von Nam *et al.*, 1989, *Plant Cell*, 1:699-705, und Tanksley *et al.*, 1992, *Genetics*, 132:1141-1160, entwickelt worden. Grill und Somerville, 1991, *Mol. Gen. Genet.*, 226:484-490, und Martin *et al.*, 1992, *Mol. Gen. Genet.*, 233:25-32, beschreiben die Erstellung von YAC-Bibliotheken.

In der klassischen genetischen Karte der Tomate kartiert der *Ls*-Locus auf dem langen Arm von Chromosom 7 (Taylor und Rossall, 1982, *Planta*, 154:1-5). Schumacher *et al.*, 1995, *Mol. Gen. Genet.*, 246:761-766, beschreiben eine Integration des *Ls*-Locus in die RFLP-Karte wobei der *Ls*-Locus in einem 0,8 cM-Intervall nahe dem distalen Ende von Chromosom 7

8
kartiert wurde. Weiterhin beschreiben Schumacher et al., daß der *La*-Locus durch die RFLP-Marker CD61 und CD65 begrenzt wird. Die physikalische Kartierung mittels Pulsfeldgelelektrophorese zeigte, daß CD61 und CD65 nicht mehr als 375 kb voneinander entfernt liegen.

5 Bei vielen Nutzpflanzen ist die Bildung von Seitentrieben vom Standpunkt der landwirtschaftlichen Nutzung her aus verschiedenen Gründen unerwünscht:

1. Die jungen Seitentriebe sind zunächst "Sink"-Organe (Verbraucher-Organe) und reduzieren
10 daher den Ertrag am Hauptsproß.
2. Stark verzweigte Sproßsysteme stellen für eine mechanische Bearbeitung (z.B. maschinelle Ernte) oft ein kaum überwindliches Hindernis dar.

Aus diesen Gründen ist schon frühzeitig versucht worden, seitentriebsfreie Sorten auf
15 konventionellem Wege zu züchten. Bei einzelnen Nutzpflanzen (z.B. Sonnenblume) ist dies gelungen. Dagegen ist bei vielen anderen dikotylen Nutzpflanzen (z.B. Tomate, Gurke, Apfelbaum, Birnbaum) die Einstämmigkeit zwar wünschenswert, konnte aber bisher nicht in leistungsfähigen Zuchtsorten realisiert werden. Auch bei monokotylen Nutzpflanzen wie Mais und Zuckerrohr ist die Unterdrückung der Seitentriebbildung von Vorteil und für die
20 gewerbliche Nutzung sehr erwünscht. Zur Zeit wird bei dem in Mittel- und Nordeuropa üblichen Gewächshausanbau z.B. der Tomate die Einstämmigkeit dadurch erreicht, daß die Seitentriebe manuell entfernt werden. Da das Entfernen der Seitentriebe nicht maschinell ausgeführt werden kann, ist dies mit einem hohen Kostenaufwand verbunden. Außerdem sind die Pflanzen an den Wundstellen für Infektionen durch Pathogene wie pathogene Bakterien,
25 Viren und Pilze sehr empfänglich, weshalb die Entfernung der Seitentriebe häufig zu einer Ausbreitung von Krankheiten im Gewächshaus beiträgt.

Dagegen ist bei vielen Zierpflanzen die zusätzliche Ausbildung von Seitentrieben und als Folge davon eine vermehrte Blütenbildung erwünscht. Die vermehrte Seitentriebbildung ist ebenfalls
30 bei verschiedenen Nutzpflanzen wie Kartoffeln, dem Kaffee- oder Teestrauch von hohem Nutzen. Es besteht somit ein Bedarf an kostengünstigen, leistungsfähigen Nutzpflanzen und Zierpflanzen, in denen die Seitentriebbildung verstärkt oder unterdrückt ist.

Eine Inhibition der Ausbildung von Abscissionszonen ist in einer Reihe von Pflanzen von
35 Interesse. So führt der vorzeitige Abwurf von Früchten bei Zitruspflanzen zu Ertragsverlusten,



die sich verhindern ließen, wenn keine Abscissionszonen ausgebildet würden. Ähnliches findet sich auch bei anderen Obstsorten wie Kirschen, Pfirsichen oder Johannisbeeren. Ferner ist eine Inhibition der Ausbildung von Abscissionszonen z.B. in der Tomatenpflanze von Vorteil. Werden die Abscissionszonen nicht ausgebildet, löst sich die Frucht bei der Ernte ohne Reste des Fruchtsiels und der Kelchblätter von der Pflanze. Diese Eigenschaft ist erwünscht, wenn die Tomaten maschinell geerntet und anschließend zu Produkten wie Tomatenmark verarbeitet werden, da die Kelchblätter und Fruchtsiele die Qualität der Tomatenprodukte verschlechtern.

Eine verstärkte Ausbildung von Abscissionszonen kann bei Zierpflanzen dazu genutzt werden, daß die Blüten nach dem Abblühen von selbst abfallen und nicht wie bei vielen Balkon- und Gartenpflanzen manuell entfernt werden müssen. Falls dies unterbleibt, wird oft die Bildung neuer Blüten unterdrückt.

Kurze Beschreibung der Erfindung

Die Isolierung und Klonierung des *Ls*-Gens würde die Möglichkeit eröffnen, die Aktivität dieses Gens gezielt zu verändern und damit in transgenen Pflanzen die Anlage von Seitentrieben entweder zu unterdrücken oder zu verstärken. Ferner wird die Möglichkeit eröffnet, durch gezielte Veränderung der Aktivität des *Ls*-Gens die Bildung von Abscissionszonen in den Blütenstielen zu unterdrücken oder zu verstärken. Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, das *Ls*-Gen oder ein DNA-Fragment, das dieses Gen enthält, zu isolieren, seine Sequenz zu bestimmen und ein Verfahren zur Erzeugung von transgenen Pflanzen bereitzustellen, in denen die Aktivität des *Ls*-Gens gezielt verändert wurde, um die Anlage von Seitentrieben und/oder die Bildung von Abscissionszonen in den Blütenstielen entweder zu unterbinden oder zu verstärken.

Die Aufgabe der Erfindung wird durch die Bereitstellung einer Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO.1 und von Nukleotidsequenzen, die mit der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO.1 hybridisieren, gelöst, wobei die Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO.1 und die Nukleotidsequenzen, die mit der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID NO.1 hybridisieren, Polypeptide codieren, die für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlich sind. Der Ausdruck "Hybridisierung" bezieht sich erfindungsgemäß auf konventionelle Hybridisierungsbedingungen, bevorzugt bezieht sich "Hybridisierung" auf solche Hybridisierungsbedingungen, bei denen der T_m -Wert im Bereich



von T_M -Wert 45°C bis T_M -Wert 68°C liegt. Besonders bevorzugt bezieht sich der Begriff "Hybridisierung" auf stringente Hybridisierungsbedingungen. Ferner betrifft die Erfindung die durch die Nukleotidsequenzen codierten Polypeptide und Aminosäuresequenzen.

5 Eine weitere Aufgabe der Erfindung wird durch ein Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung gelöst, wobei die für die Steuerung der Seitentriebbildung d/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat stabil in das Genom von Pflanzenzellen oder Pflanzengeweben integriert wird und die erhaltenen Pflanzenzellen oder
10 Pflanzengewebe zu Pflanzen regeneriert werden.

In der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren bevorzugt, bei dem die integrierte DNA die Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung unterdrückt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren bei dem die integrierte DNA in Antisense-Orientierung zur komplementären, die
15 Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung steuernden, endogenen Sequenz exprimiert wird. Ebenfalls besonders bevorzugt ist ein Verfahren bei dem die integrierte DNA in Sense-Orientierung zur komplementären, die Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung steuernden, endogenen Sequenz exprimiert wird. Weiterhin besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Seitentriebbildung und/oder
20 Abscissionszonenbildung durch ein Ribozym, umfassend die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder deren Fragment oder Derivat, unterdrückt wird. Weiterhin besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder deren Fragment oder Derivat eingesetzt wird, um das endogene Gen in Pflanzen durch homologe Rekombination auszuschalten ("knock-out").

In der vorliegenden Erfindung wird ferner ein Verfahren bevorzugt, bei dem die ins Genom der Pflanzen integrierte DNA die Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verstärkt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die erfindungsgemäße DNA in Sense-Orientierung zur für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung
30 verantwortlichen endogenen Sequenz exprimiert wird.

Insbesondere bevorzugt ist das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von transgenen Tomaten- und Löwenmaulpflanzen. Insbesondere bevorzugt ist auch ein erfindungsgemäßes Verfahren zur Herstellung von transgenen Pflanzen, wobei die ins Genom der Pflanzen
35 integrierte DNA die Sequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder deren Fragment oder Derivat umfaßt,

oder komplementär zu dieser Sequenz oder deren Fragment oder Derivat ist, oder mit der Sequenz gemäß SEQ ID No. 1 oder deren Fragment oder Derivat hybridisiert und ein Polypeptid mit der biologischen Aktivität der Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung codiert.

Die Erfindung betrifft weiterhin transformierte Pflanzenzellen oder transformiertes Pflanzengewebe, bei dem eine für die Kontrolle der Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat stabil in das Genom der Pflanzenzelle oder das Pflanzengewebe integriert ist. Die Erfindung betrifft ferner Pflanzen sowie das Saatgut von Pflanzen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlich sind.

Die Erfindung wird weiter durch die folgenden Zeichnungen erläutert.

In Zeichnung 1 ist der Ablauf einer positionellen Klonierung schematisch dargestellt.

In Zeichnung 2 ist (a) ein Ausschnitt aus der von Tanksley *et al.*, 1992, Genetics, 132:1141-1160 veröffentlichten RFLP-Karte dargestellt. In (b) ist die *Ls*-Region nach Schumacher *et al.*, 1995, Mol. Gen. Genet., 246:761-766, in diese Karte integriert.

Zeichnung 3 zeigt die Kartierung von cDNA- und Cosmid-Klonen aus der *Ls*-Region. Die Cosmid-Klone A, B, C, D, E, F, G und L sowie der YAC-Klon CD61-5 sind durch Balken symbolisiert. Die Positionen der cDNA-Klone c10, c21, y25 und ET sind durch offene Rechtecke dargestellt. Die gestrichelten Linien symbolisieren Rekombinationspunkte in den F2-Pflanzen 23, 24, 865 und 945.

Zeichnung 4 zeigt die Autoradiographie einer Southern-Blot-Analyse zum Nachweis von *Ls*-verwandten Genen in verschiedenen Pflanzenarten. Genomische DNA aus Tomate (*L. esculentum*), Kartoffel (*S. tuberosum*) und Löwenmaul (*A. majus*) wurde mit dem Restriktionsenzym EcoRI behandelt und mit dem cDNA-Klon ET hybridisiert.

In Zeichnung 5 ist die Nucleotidsequenz und die davon abgeleitete Aminosäuresequenz des Wildtyp *Ls*-Gens aus der Tomate aufgeführt.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

Die Methode der Klonierung mehrerer hundert Kilobasen großer DNA-Fragmente als künstliche Hefe-Chromosomen (Yeast Artificial Chromosome: YAC) in *Saccharomyces*

12

9 8 7 6 5 4 3 2 1

cerevisiae (Burke *et al.*, 1987, Science, 236:806-812) erlaubt die Umsetzung der physikalischen Karte in eine Reihe überlappender YAC-Klone, die das zu isolierende Gen überspannen. Aus einer YAC-Bibliothek der Tomate (Martin *et al.*, 1992, Mol. Gen. Genet., 233:25-32) wurden Klone isoliert, die den RFLP-Marker CD61 enthielten. Durch Kartierung der YAC-Endfragmente relativ zu den das *Ls*-Gen flankierenden RFLP-Markern sowie zu den Rekombinationsbruchpunkten und zum *Ls*-Gen selbst wurde die Lage der isolierten DNA-Fragmente in der *Ls*-Region bestimmt. Dabei stellte sich heraus, daß der YAC-Klon CD61-5 sowohl mit CD61 als auch mit CD65 hybridisierte und somit den gesamten genomischen Abschnitt einschließlich des *Ls*-Gens enthält. In Zeichnung 3 ist die Lage der Marker und des YAC-Klons schematisch dargestellt.

Zur Identifizierung von innerhalb dieses YAC-Klons gelegenen kodierenden Regionen wurde dieser Klon als radioaktiv markierte Sonde zur Durchmusterung einer cDNA-Bibliothek (Simon, 1990, Dissertation, Universität zu Köln, Köln, FRG) eingesetzt. Die verwendete cDNA-Bibliothek ist aus RNA sowohl aus vegetativen als auch aus floralen Sproßspitzen hergestellt worden und repräsentiert somit die exprimierten Gene der Gewebe, in denen sich der Phänotyp der *Ls*-Mutation manifestiert. Eine Charakterisierung der cDNA-Klone durch kreuzweises Hybridisieren ergab, daß die gereinigten Klone insgesamt 29 verschiedene Transkripte repräsentierten. Bei der anschließenden Feinkartierung der cDNA-Klone relativ zu den Rekombinationsbruchpunkten im Intervall CD61-CD65 stellte sich heraus, daß nur der cDNA-Klon y25 mit dem *Ls*-Gen kosegregierte und als Kandidat für dieses Gen in Frage kam. Im Anschluß an die Etablierung eines Cosmid-"Contigs" wurden auch Cosmid-Klone als Sonden eingesetzt, um weitere cDNA-Klone aus dem CD61-CD65-Intervall zu isolieren, die beim Durchmustern mit dem YAC-Klon CD61-5 als Sonde aufgrund der hohen Komplexität der Sonde nicht nachweisbar waren. In diesen Experimenten wurden drei weitere cDNA-Klone (c10, c21 und ET) isoliert, die ebenfalls mit dem *Ls*-Gen kosegregierten und als weitere Kandidaten für das *Ls*-Gen in Frage kamen. Es wurden somit insgesamt vier cDNA-Klone aus der *Ls*-Region identifiziert, die Kandidaten für das *Ls*-Gen waren. Die Klone sind in Zeichnung 3 durch offene Rechtecke dargestellt.

Um das *Ls*-Gen zusammen mit den für die Steuerung der Expression notwendigen Promotorsequenzen zu klonieren, wurde der cDNA-Klon y25 als Ausgangspunkt für die Isolierung von kürzeren genomischen DNA-Fragmenten aus der *Ls*-Region benutzt. Zu diesem Zweck wurde eine genomische Cosmid-Bibliothek der Tomate in dem Vektor pCLD04541 (Bent *et al.*, 1994, Science, 265:1856-1860) etabliert. Dieser Vektor enthält die zur

Pflanzentransformation notwendigen T-DNA-"border"-Sequenzen und erlaubt daher eine Einführung der isolierten DNA-Fragmente in Pflanzenzellen ohne weitere Klonierungsschritte. Aus dieser Bibliothek wurde in mehreren üblichen Klonierungsschritten eine Reihe von überlappenden Cosmid-Klonen isoliert. Die Kartierung dieser Cosmid-Klone relativ zu den Rekombinationsbruchpunkten im untersuchten Intervall zeigte, daß die isolierten genomischen DNA-Fragmente zusammen einen genomischen Abschnitt von ca. 60 kb zwischen den nächstgelegenen Rekombinationsbruchpunkten beiderseits des *Ls*-Gens überspannen. Die Lage der Cosmid-Klone ist in Zeichnung 3 schematisch dargestellt.

Zur Untersuchung der Frage, ob ein Gen aus dem als Cosmid-"Contig" isolierten genomischen DNA-Abschnitt die in der *Ls*-Mutante fehlende biologische Funktion zur Anlage von Seitentrieben, Petalen und Abscissionszonen ersetzen kann (Komplementationsexperiment), wurde die *Ls*-Mutante mit den Cosmid-Klonen A, B, C, D, E, F, G und L transformiert. Bei allen Transgenen, die durch Einführung der Cosmide A, B, C, D, E und F hergestellt wurden, konnte keine Veränderung des Phänotyps beobachtet werden. Dagegen war bei acht unabhängigen transgenen Pflanzen, die entweder das Cosmid G oder L enthielten, eine partielle oder vollständige Wiederherstellung des Wildtyp-Phänotyps, zu beobachten. Die Ergebnisse der Komplementationsexperimente sind in Tabelle I aufgeführt.

Cosmid	Zahl der transformierten Pflanzen	Zahl der komplementierten Pflanzen
pCLDO4541	8	0
A	5	0
B	15	0
C	5	0
D	7	0
E	2	0
F	8	0
G	5	3
L	11	5

Tabelle 1: Versuche zur Komplementation der *Ls*-Mutante durch Cosmid-Transformation



Diese transgenen Pflanzen bilden während der vegetativen Entwicklung Seitentriebe und in der Blütenentwicklung wieder Petalen und Abscissionszonen. Eine Southern-Blot-Analyse der transgenen Cosmid G oder Cosmid L enthaltenden Pflanzen ergab, daß bei Pflanzen, die keine Komplementation zeigten, die T-DNA nur unvollständig übertragen worden war. Somit ist gezeigt worden, daß die eingeführten DNA-Fragmente die in der Mutante nicht vorhandene genetische Information zur Anlage von Seitentrieben, Petalen und Abscissionszonen komplementieren können.

Aufgrund von Komplementationsexperimenten mit Subfragmenten des Cosmids G ließ sich der DNA-Abschnitt, in dem das *Ls*-Gen liegt, genauer bestimmen. Während nach Transformation mit DNA-Fragmenten, die das zuvor identifizierte Gen *c21* enthielten, keine Komplementation des *ls*-Phänotyps beobachtet wurde, konnte durch Einführung eines ca. 6 Kb-Fragments, das das Gen ET trägt, in zwei unabhängigen transgenen Pflanzen der Wildtyp-Phänotyp wiederhergestellt werden. Eine DNA-Sequenzanalyse ergab, daß das ET-Gen der *ls*¹-Mutante eine Deletion von 1550 Bp trägt, die die ersten 185 Aminosäuren des Proteins und 865 Bp der davor gelegenen Sequenz entfernt. Ein zweites unabhängiges mutantes Allel, *ls*², enthält ein 3 Bp-Insertion und mehrere Punktmutationen in einem kurzen DNA-Abschnitt, von denen eine zu einem Abbruch des Proteins nach 24 Aminosäuren führt. Aus den Komplementationsexperimenten und der Isolierung und Kartierung der cDNAs, sowie den Sequenzanalysen des Gens ET aus dem Wildtyp und zwei unabhängigen *ls*-Allelen ergab sich, daß der cDNA-Klon ET die gesamte codierende Sequenz der mRNA des *Ls*-Gens repräsentiert.

Zur Untersuchung der Frage, ob ähnliche oder homologe Gene auch in anderen Pflanzenarten vorkommen, wurde der cDNA-Klon ET als Hybridisierungssonde in Southern-Experimenten unter reduzierter Stringenz eingesetzt. Der Ausdruck "Pflanze" umfaßt, wie er hier verwendet wird, monokotyle und dikotyle Nutz- und Zierpflanzen. Der Begriff der "reduzierten Stringenz" betrifft hier übliche Hybridisierungsbedingungen mit der Abweichung, daß die Hybridisierungstemperatur zwischen 50°C und 55°C lag. In Kartoffel (*Solanum tuberosum*) und Löwenmaul (*Antirrhinum majus*) konnten mehrere DNA-Fragmente nachgewiesen werden. Aus Löwenmaul und Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*) wurden durch Hybridisierung bei 55°C mehrere genomische Klone isoliert. Eine DNA-Sequenzanalyse ergab, daß der isolierte Löwenmaul-Klon signifikante Sequenzhomologien zum *Ls*-Gen besitzt. Homologe Gene zum *Ls*-Gen der Tomate können demnach unter Verwendung des cDNA-Klons ET als Sonde nach üblichen Verfahren isoliert werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner DNA-Sequenzen, die aus einem pflanzlichen Genom stammen und ein Protein kodieren, das zur Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Bildung von Petalen und/oder Bildung von Abscissionszonen notwendig ist. Die in der Nukleotidsequenz enthaltene Information führt bei Einführung und Expression in pflanzlichen Zellen zur Bildung einer Ribonukleinsäure. Über diese Ribonukleinsäure kann eine Proteinaktivität in die Zellen eingeführt oder eine endogene Proteinaktivität unterdrückt werden. Besonders bevorzugt ist eine DNA-Sequenz gemäß SEQ ID No. 1 aus *Lycopersicon esculentum*, die in Zeichnung 5 dargestellt ist.

Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung die Verwendung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen oder Fragmente oder Derivate, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von diesen DNA-Sequenzen abgeleitet sind, zur Transformation von Pflanzenzellen. Die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können unter Verwendung verschiedener Verfahren eingesetzt werden, um die Bildung von Seitentrieben und somit Verzweigungen des Sproßsystems und/oder Abscissionszonen zu unterdrücken:

1. Um die Bildung von Seitentrieben und/oder Abscissionszonen zu unterdrücken, kann die erfindungsgemäße DNA-Sequenz in Antisense (Gegensinn)- oder Sense (Sinn)-Orientierung in übliche Vektoren (z.B. Plasmide) kloniert werden und dabei mit Steuerelementen für die Expression in pflanzlichen Zellen, wie Promotoren und Terminatoren, kombiniert werden. Mit den hergestellten Vektoren können pflanzliche Zellen transformiert werden mit dem Ziel, die Synthese des endogenen Proteins zu verhindern. Zu diesem Zweck können auch kürzere Teile der erfindungsgemäßen DNA-Sequenz, also Fragmente, oder DNA-Sequenzen mit Sequenzähnlichkeit von 50% bis 100%, also Derivate, verwendet werden. Die gezielte Unterdrückung einer Genaktivität in pflanzlichen Zellen durch Einführung von Antisense- oder Sense-Konstrukten ist ein übliches Verfahren, das in vielen Fällen erfolgreich eingesetzt worden ist (Gray *et al.*, 1992, Plant. Mol. Biol., 19:69-87).

2. Weiterhin kann die Bildung von Seitentrieben und/oder Abscissionszonen durch Expression eines für diesen Zweck konstruierten Ribozyms unter Verwendung der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen inhibiert werden. Die Herstellung und Verwendung von Ribozymen wird in de Feyter *et al.*, 1996, Mol. Gen. Genet., 250:329-338 für Tabakmosaikvirus-resistente Tomaten- und Tabakpflanzen beschrieben.

3. Außerdem kann die erfindungsgemäße DNA-Sequenz verwendet werden, um das endogene Gen zu inaktivieren. Anhand der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen können Oligonukleotide synthetisiert werden, um Pflanzen im Rahmen von Mutageneseexperimenten mit Hilfe der PCR-Technik auf die Anwesenheit von Insertionen (z.B. transponierbare Elemente oder die T-DNA von *Agrobacterium tumefaciens*) im *Ls*-Gen zu testen. Durch solche Insertionen wird die Genaktivität in der Regel blockiert (Koes *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92:8149-8153).

4. Ebenfalls kann die erfindungsgemäße DNA-Sequenz eingesetzt werden, um das endogene *Ls*-Gen durch homologe Rekombination auszuschalten ("knock-out"). Dieses Verfahren wurde bei Mäusen erfolgreich eingesetzt und ist auch für die Anwendung in Pflanzen von Miao und Lam, 1995, Plant. J., 7:359-365 beschrieben worden.

Im Gegensatz zur Tomate und anderen Nutzpflanzen werden bei Zierpflanzen (z.B. Geranien, Fuchsien, Chrysanthemen) häufig Phänotypen bevorzugt, die aufgrund einer starken Entwicklung der Seitentriebe einen buschigen Wuchs zeigen. Um diese Wuchsformen zu erzeugen, werden die Pflanzen heute entweder dekapitiert, was das Austreiben der Seitenachsen fördert, oder mit bestimmten Chemikalien behandelt. Auch diese Praxis ist mit einem beträchtlichen finanziellen Aufwand verbunden. Die erfindungsgemäße Herstellung von transgenen Pflanzen mit buschigen Wuchsformen stellt in diesen Fällen eine kostengünstigere Alternative dar.

Eine verstärkte Ausbildung von Abscissionszonen kann bei Zierpflanzen dazu genutzt werden, daß die Blüten nach dem Abblühen von selbst abfallen und nicht wie bei vielen Balkon- und Gartenpflanzen manuell entfernt werden müssen. Falls dies unterbleibt, wird oft die Bildung neuer Blüten unterdrückt.

Zur Herstellung von transgenen Pflanzen mit starker Seitentriebentwicklung und/oder Abscissionszonenbildung wird die erfindungsgemäße DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat, das durch Insertion, Deletion oder Substitution von dieser Sequenz abgeleitet ist, in Sense-Orientierung in Plasmide eingebracht und mit Steuerelementen für die Expression in pflanzlichen Zellen kombiniert. Mit diesen Plasmiden können pflanzliche Zellen transformiert werden, mit dem Ziel der Expression einer translatierbaren Botenribonukleinsäure (mRNA), die die Synthese eines Proteins erlaubt, welches die Bildung und Entwicklung von Seitentrieben und/oder Abscissionszonen stimuliert.

Die erfindungsgemäße DNA-Sequenz oder Fragmente oder Derivate, die durch Insertion, Deletion oder Substitution von dieser Sequenz abgeleitet sind, können dazu genutzt werden, aus dem Genom der Tomate oder anderer Pflanzen homologe oder ähnliche DNA-Sequenzen zu isolieren, die ebenfalls die Bildung von Seitentrieben und/oder Abscissionszonen beeinflussen. Zu diesem Zweck können die erfindungsgemäße DNA-Sequenz oder Fragmente, z.B. Oligonukleotide, oder Derivate als Sondenmoleküle (engl.: *probe*) eingesetzt werden, um nach üblichen Verfahren cDNA-Bibliotheken oder genomische DNA-Bibliotheken der zu durchmusternden Pflanzen abzusuchen. Alternativ dazu können von der erfindungsgemäßen Sequenz degenerierte oder nicht degenerierte Oligonukleotide (Primer) abgeleitet werden, die zur Durchmusterung dieser cDNA-Bibliotheken oder genomischen DNA-Bibliotheken auf PCR-Basis benutzt werden können. Die so isolierten verwandten DNA-Sequenzen können ebenso wie die erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen zur Inhibition oder Stimulation der Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonen bei Pflanzen eingesetzt werden.

Zur Expression der erfindungsgemäßen DNA-Sequenzen in Sense- oder Antisense-Orientierung in pflanzlichen Zellen sind einerseits Transkriptionspromotoren und andererseits Transkriptionsterminatoren notwendig. Promotoren und Terminatoren sind in großer Zahl in der Literatur beschrieben (z.B. Köster-Töpfer *et al.*, 1989, Mol. Gen. Genet., 219:390-6; Rocha-Sosa *et al.*, 1989, EMBO J., 8:23-29). Die transkriptionellen Start- und Terminationsbereiche können entweder aus der Wirtspflanze oder aus einem heterologen Organismus stammen. Die DNA-Sequenzen der Transkriptionsstart- und Transkriptionsterminationsregionen können synthetisch hergestellt oder natürlich gewonnen sein oder eine Mischung aus synthetischen und natürlichen DNA-Bestandteilen enthalten.

Verfahren zur genetischen Modifikation sind sowohl für dikotyle als auch für monokotyle Pflanzen beschrieben worden (Gasser und Fraley, 1989, Science, 244:1293-1299; Potrykus, 1991, Ann. Rev. Plant. Mol. Biol. Plant. Physiol., 42:205-226). Neben der Transformation mit Hilfe von *Agrobacterium tumefaciens* (Hoekema, 1983, Nature, 303:179-180; Filatti *et al.*, 1987, Biotech., 5:726-730) kann DNA durch Transformation von Protoplasten, Mikroinjektion, Elektroporation oder ballistische Methoden in Pflanzenzellen eingeführt werden. Zur Selektion von transformierten Pflanzenzellen wird die einzuführende DNA mit einem Selektionsmarker gekoppelt, der den Zellen eine Resistenz gegenüber Antibiotika (z.B. Kanamycin, Hygromycin, Bleomycin) verleiht. Aus den transformierten Pflanzenzellen können dann in einem üblichen Selektionsmedium ganze Pflanzen regeneriert werden. Die

Regenerierung von Pflanzenzellen ist beschrieben, z.B. in der EP-B.0 242 236, auf die hier
speziell Bezug genommen wird. Die so erhaltenen Pflanzen werden mit üblichen
molekularbiologischen Methoden auf Anwesenheit und Intaktheit der eingeführten DNA
getestet. Ist die eingeführte DNA einmal im Genom integriert, so ist sie dort in der Regel stabil
5 und wird an die Nachkommen vererbt. Von den so erhaltenen Pflanzen kann dann mit den
üblichen Verfahren Saatgut erhalten werden.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung. Die Beispiele sind nicht einschränkend
aufzufassen. Wenn nicht anders angegeben wurden molekularbiologische Standardmethoden
10 benutzt, wie von Sambrook *et al.*, 1989, Molecular cloning: A Laboratory Manual 2. Auflage,
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York beschrieben. Southern-
Hybridisierungen wurden in 6 x SSPE (0,9 M NaCl, 50 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 5 mM EDTA,
0,1% BSA, 0,1% Ficoll, 0,1% PVP, 0,5% SDS, 100 µg/ml Kalbsthymus-DNA) mit einer
Hybond N⁺ Membran (Amersham) durchgeführt. Plaque-Hybridisierungen wurden in 6 x SSPE
15 (1,08 M NaCl, 60 mM NaH₂PO₄ x H₂O, 6 mM EDTA, 0,1% BSA, 0,1% Ficoll, 0,1% PVP,
0,1% SDS, 200 µg/ml Kalbsthymus-DNA) mit einer Hybond N⁺ Membran (Amersham)
durchgeführt.

20 Beispiel 1

Isolierung von YAC-Klonen aus *Ls*-Region der Tomate

Aus einer YAC-Bibliothek der Tomate (Martin *et al.*, 1992, Mol. Gen. Genet., 233:25-32)
wurden Klone isoliert, die den Marker CD61 enthielten. Hierzu wurden zunächst DNA-
25 Gemische, die von jeweils einer Mikrotiterplatte mit 96 YAC-Klonen stammten, mittels des
üblichen PCR-Verfahrens untersucht. So konnten unter 144 solcher DNA-Gemische neun
identifiziert werden, die mit den Primern CD61-F und CD61-R ein PCR-Produkt ergaben. Die
Isolierung der Einzelklone erfolgte mittels Koloniehybridisierung bzw. mittels einer PCR, bei
der die DNA der Klone einer Reihe bzw. Spalte einer Mikrotiter-Platte als Gemisch eingesetzt
30 wurde. Einzelklone wurden so unter 96 Klonen einer Platte mittels 20 PCR-Reaktionen
identifiziert. Es wurden insgesamt fünf YAC-Klone identifiziert, deren Insertgröße mittels
Pulsfeldgelelektrophorese (Chu *et al.*, 1986, Science, 234:1582-1585) zu 280-320kb bestimmt
wurde. In PCR und Southern-Experimenten wurde gezeigt, daß der YAC CD61-5 neben
CD61 auch den zweiten flankierenden Marker CD65 trug und somit den *Ls*-Locus
35 überspannte.

15.04.97

Beispiel 2

Isolierung von cDNA-Klonen der *Ls*-Region der Tomate

5 Für die Herstellung einer Hybridisierungssonde wurde DNA des YAC-Klons CD61-5 nach Auftrennung mittels Pulsfeldgelelektrophorese isoliert. Die Auftrennung auf diesem Pulsfeldgel erlaubte jedoch nur eine relativ grobe Präparation, so daß die eingesetzte Sonde neben dem YAC-Klon CD61-5 auch Anteile von DNA der Hefe-Chromosomen III (360kb) und VI (280kb) enthielt. Nach radioaktiver Markierung wurde diese DNA als Sonde für das Screening
10 von 5×10^5 pfu (plaque forming units) in einer konventionellen Plaquehybridisierung eingesetzt. Die Hybridisierung mit der YAC-Sonde lieferte eine Vielzahl von Signalen unterschiedlicher Intensität. Für das Rescreening wurden 50 Plaques verschiedener Signalstärken ausgewählt und 44 aufgereinigte Klone konnten anschließend mittels kreuzweiser Hybridisierung gruppiert werden. 23 der 44 aus dem Rescreening hervorgegangenen Klone waren nur einmal vertreten.
15 Insgesamt wurden bei diesem Screening 29 verschiedene Transkripte identifiziert. Nach der Etablierung eines Cosmid-"Contigs" wurde die cDNA-Bibliothek nochmals mit den Cosmid-Klonen als Sonden durchmustert, um weitere cDNA-Klone zu isolieren, die beim Screening mit dem YAC61-5 als Sonde aufgrund der hohen Komplexität der Sonde nicht nachweisbar waren. In diesen Experimenten wurden drei weitere cDNA-Klone isoliert. Insgesamt wurden somit 32
20 verschiedene Transkripte nachgewiesen.

Beispiel 3

RFLP-Kartierung der isolierten cDNA-Klone

25 Von den 30 identifizierten Transkripten zeigten 22 für "single"- oder "low-copy"- Sequenzen typische Hybridisierungsmuster, die eine RFLP-Kartierung erlaubten. In einer ersten RFLP-Analyse wurden die isolierten cDNA-Klone gegen Filter hybridisiert, die mit den Restriktionsenzymen EcoRI, EcoRV und XbaI verdaute DNA aus *L. esculentum*, *L. pennellii* sowie aus der Rückkreuzungslinie IL83 (Eshed *et al.*, 1992, Theor. Appl. Genet., 83:1027-
30 1034) trugen. Diese Linie, bei der das distale Ende von Chromosom 7 aus *L. pennellii* stammt, während der Rest des Genoms aus *L. esculentum*-Chromosomen besteht, erlaubt bei Vorliegen eines Polymorphismus zwischen *L. esculentum* und *L. pennellii* eine erste Grobkartierung. Stammt ein polymorphes DNA-Fragment aus der *Ls*-Region, so zeigte die Linie IL83 das *L. pennellii*-Allel, während für Fragmente aus dem Rest des Genoms das *L. esculentum*-Allel
35 auftrat. Auf diese Weise wurden vier cDNA-Klone identifiziert, die nicht von Chromosom 7

15.11.97

stammen. Die Feinkartierung der 18 verbleibenden cDNA-Klone, die von Chromosom 7 stammen, erfolgte über die RFLP-Analyse der Pflanzen W23 und W24, welche Rekombinationsereignisse im Intervall CD61-*Ls* bzw. *Ls*-CD65 trugen. Da Kandidaten für das *Ls*-Gen in dieser Analyse in Pflanze W23 sowohl das *L. esculentum*- als auch das *L. pennellii*-spezifische Fragment zeigten, während in Pflanze W24 nur das *L. esculentum*-spezifische Fragment auftrat, wurden die cDNA-Klone gegen Filter hybridisiert, die mit EcoRI, EcoRV oder XbaI gespaltene genomische DNA der beiden Elternspezies sowie der beiden Rekombinanten W23 und W24 trugen. Auf diese Weise wurden insgesamt vier cDNA-Klone identifiziert, die mit dem *Ls*-Gen kosegregierten, und somit als Kandidaten für das *Ls*-Gen in Frage kamen.

Beispiel 4

Erstellung und Durchmusterung einer genomischen Cosmidbank der Tomate

DNA des T-DNA/Cosmidvektors pCLD04541 (Bent *et al.*, 1994, Science, 265:1856-1860) wurde nach dem Protokoll von Sambrook *et al.*, 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, isoliert, über zwei CsCl-Gradienten gereinigt und über 3 Tage gegen TE dialysiert. Die DNA wurde mit BamHI vollständig gespalten und anschließend mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert, um eine Autoligation des Vektors zu verhindern. 200ng genomische MboI-partialverdaute Tomaten-DNA und 2mg Vektor-DNA wurden mit T4-DNA-Ligase in 10ml ÜN bei 16°C ligiert. 3ml des Ligationsansatzes wurden zur Verpackung eingesetzt und in *E. coli* SURE (Stratagene) transfiziert. Der Ansatz ergab 6×10^6 unabhängige rekombinante Bakterien. Es wurden 100 Platten mit jeweils 2500 cfu (colony forming units) plattiert und mit jeweils 10ml LB-Medium abgeschwemmt. Aus diesem Material wurde jeweils eine Glycerinkultur angelegt und eine DNA-Präparation durchgeführt. Diese 100 DNA-Pools wurden mittels einer PCR-Analyse durchmustert. Positive Pools wurden dann einer Koloniefilterhybridisierung zur Identifizierung der positiven Einzelklone unterzogen.

Beispiel 5

Klonierung und Sequenzierung des *Ls*-Gens

Das Insert des cDNA-Klons ET, der bei der Durchmusterung der cDNA-Bank mit Cosmid G als Sonde isoliert wurde, wurde mit EcoRI ausgeschnitten und in den Vektor pGEM-11Zf(+) kloniert. Das fehlende 5'-Ende des Gens wurde mit Hilfe der RACE-Technik (Frohman *et al.*,

18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8998-9002) isoliert. Hierbei wurde ausgehend von einem Oligonukleotid, das spezifisch an schon bekannte Bereiche des Gens bindet, eine komplementäre DNA (cDNA) zur RNA hergestellt. Anschließend wurden mit Terminaler Transferase Desoxycytosinnukleotide an die cDNA angehängt. Mit einem zweiten genspezifischen Primer und einem Primer der an den Polydesoxycytosinschwanz bindet, wurde das 5'-Ende der cDNA mittels PCR amplifiziert und in den Plasmidvektor pGEM-T kloniert. Anschließend wurden die längsten dieser RACE-Klone sequenziert. Parallel zur Analyse des cDNA-Klons ET wurden Subfragmente des entsprechenden genomischen Bereichs des Cosmids G isoliert und in die Plasmidvektoren pGEM-4Z bzw. pSPORTI umkloniert. Überlappende Subfragmente wurden anschließend sequenziert. Die genomische Sequenz zeigte keine Abweichung zur Sequenz des cDNA-Klons, was bedeutet, daß das *Ls*-Gen kein Intron besitzt. Desweiteren wurden die entsprechenden Genomabschnitte der beiden Mutanten *ls*¹ und *ls*² mittels PCR mit geeigneten Primern aus den genomischen DNAs amplifiziert und in den Vektor pGEM-T kloniert. Die Sequenzanalyse dieser Produkte zeigte beim *ls*¹-Allel eine Deletion von 1,5 Kb im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz. Neben dem Verlust der Nukleotide 1-685 des offenen Leserasters fehlen der *ls*¹-Mutante demnach auch 865 Basenpaare der 5' vom offenen Leseraster gelegenen Region, die wahrscheinlich eine regulatorische Funktion (Promotor) für die Expression besitzt. Es ist daher anzunehmen, daß die *ls*¹-Mutante kein funktionsfähiges Protein des *Ls*-Gens mehr bilden kann. Im *ls*²-Allel wurde eine Insertion von 3 Basenpaaren sowie 3 Basenaustausche im 5'-Bereich des offenen Leserasters gefunden. Einer der Basenaustausche führt zu einem Stopcodon, das einen Abbruch der Aminosäurekette nach 24 Aminosäuren zur Folge hat. Auch hier muß von einem funktionslosen Protein ausgegangen werden. Die Vektoren pGEM-11Zf(+), pGEM-4Z, pGEM-T wurden von der Fa. Promega Corp., Madison, USA, der Vektor pSPORTI von der Fa. Life Technologies, Eggenstein, bezogen und nach Angaben der Hersteller verwendet.

Beispiel 6

Isolierung eines *Ls*-verwandten Gens aus Löwenmaul (*Antirrhinum majus*)

Mit dem cDNA-Klon ET als Sonde wurde eine genomische Phagenbibliothek aus *Antirrhinum majus* durchmustert. Die Hybridisierung erfolgte bei 55°C, d.h. unter reduzierter Stringenz. In diesem Experiment wurden 14 Klone isoliert, von denen der Klon HH13, der die stärksten Hybridisierungssignale zeigte, weiter charakterisiert wurde. Die nach Umklonierung des Phageninserts in den Plasmidvektor pGEM-11Zf(+) durchgeführte Sequenzanalyse zeigte, daß das isolierte *Antirrhinum majus*-Gen hohe Sequenzähnlichkeit mit dem *Ls*-Gen aus der Tomate

22
15.09.97
besitzt. Innerhalb der beiden Sequenzen konnten Bereiche identifiziert werden, in denen die abgeleitete Aminosäuresequenz vollständig konserviert ist.

Beispiel 7

5 Transformation von Pflanzen mit *Ls*-cDNA-Konstrukten

Die *Ls*-cDNA wurde aus dem Plasmid GSET8 mit Sall/SstI (für Sense-Konstrukt) bzw. XbaI/SstI (für Antisense-Konstrukt) herausgeschnitten und in den XhoI/SstI (Sense-Konstrukt) bzw. XbaI/SstI (Antisense-Konstrukt) geschnittenen
10 Pflanzentransformationsvektor pBIR (Meissner, 1990, Dissertation, Universität zu Köln, Köln) ligiert. Bei den erhaltenen Klonen liegt die cDNA entweder in Sense-oder in Antisense-Orientierung zwischen dem Promotor und der Polyadenylierungsstelle des 35S-Gens des Blumenkohl-Mosaikvirus vor. Die erhaltenen Sense- bzw. Antisense-Plasmide wurden durch direkte Transformation in den *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101 (Koncz und Shell
15 *et. al.*, 1986, Mol. Gen. Genet., 204:383-396) eingeführt. Anschließend wurden die T-DNAs der beiden unterschiedlichen Konstrukte in Blattstücke von Tomate und Tabak nach Fillatti *et. al.*, 1987, Biotech., 5:726-730 transformiert.

15.04.97

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Nikolaus (Klaus) Theres
- (B) STRASSE: Schiffgesweg 30
- (C) ORT: Pulheim
- (D) BUNDESLAND: NRW
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 50259
- (G) TELEFON: 02234-89386

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder gesteuerter Anscissionszonenbildung

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1729 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

CCTCTGTCCT TCCCCCAGG TCCCCTTTT TTCTTTCTC TCTCTCCTTT ATTTCTCTTT	60
TCATAAGCAT ATTCTTTCTC TCTCTAGGGT TTCACTTTC ACCTGAAATA GTGTTGTTAA	120
ATTGAATGAT ATGTTAGGAT CCTTTGGTTC TTCATCATCT CAATCTCACC CTCATCATGA	180
TGAAGAATCT TCTGATCATC ATCAACAGCG TAGATTCACC GCTACTGCTA CAACTATCAC	240
CACCACCACC ATCACTACCT CACCAGCTAT TCAAATCCGC CAGCTACTCA TTAGCTGTGC	300
GGAGTTGATT TCGCAGTCCG ATTTCTCGGC CGCGAAAAGA CTCCTTACTA TATTATCAAC	360
TAATCATCT CCTTTTGGTG ATTCAACTGA ACGGTTAGTC CATCAATTTA CTCGCGCACT	420
TTCCCTTCGT CTCAACCGCT ATATATCGTC AACCACCAAT CATTTTCATGA CACCTGTTGA	480
AACAACCTCA ACTGATTCTT CTTCTTCGTC ATCATTAGCT CTAATTCAAT CATCATATCT	540

ATCTCTAAAC CAAGTTACCC CTTTCATAAG GTTTACTCAA TTAACCGCTA ATCAAGCGAT 600
 TTTAGAAGCG ATTAACGGTA ATCATCAAGC AATCCACATC GTTGATTTCG ACATTAAATCA 660
 5 CGGGGTTCAA TGGCCACCGT TAATGCAAGC ACTAGCTGAT CGTTACCCTG CTCCCACTCT 720
 TCGAATCACC GGTACTGGAA ATGACCTTGA TACCCTTCGT AGAACAGGTG ATCGTTTATG 780
 10 TAAATTTGCT CACTCATTAG GGTGAGATT TCAATTCCAT CCTCTTTATA TAGCCAATAA 840
 TAACCACGAT CACGATGAAG ATCCTTCTAT TATTTCTCTC ATTGTACTAC TCCCTGATGA 900
 AACCCTAGCT ATCAACTGTG TTTTCTACCT CCACCGCCTT TAAAAAGACC GCGAAAAGTT 960
 15 AAGGATTTTT TTGCATAGGG TTAAGTCAAT GAACCCTAAA ATTGTTACAA TCGCGGAGAA 1020
 GGAAGCAAAT CATAACCATC CTCTTTTTTT ACAAAGATTC ATCGAGGCGT TGGATTATTA 1080
 20 TACAGCTGTG TTTGATTCAC TGGAAGCTAC ATTGCCACCG GGTAGTCGAG AGAGGATGAC 1140
 AGTTGAACAA GTGTGGTTTG GGAGAGAGAT TGTGATATC GTTGCGATGG AAGGAGATAA 1200
 AAGGAAAGAA AGACATGAAA GGTTTAGATC ATGGGAAGTT ATGTTGAGGA GTTGTGGATT 1260
 25 TAGTAATGTT GCTTTAAGCC CTTTTCATT ATCACAAGCT AAGCTTCTTT TGAGACTTCA 1320
 TTATCCTTCT GAAGGCTATC AACTCGGAGT TTCGAGTAAT TCTTCTTCT TAGGTTGGCA 1380
 30 AAATCAACCC CTTTTCTCCA TCTCGTCTTG GCGTTGAGAA AAATATCAA ATAGCCAAC 1440
 TCAGAGGGTA ATTAAGACTA CTGATAGTTT AGGAGGGATC TGAAGAAAAC GCGTGGAGTG 1500
 AAAACCCTAA ATAACCAGAT TTTCTAATGA AGTTGTAGTA GTAGAAATTT GCATGGTGAA 1560
 35 GAACAATATT GAAGAGGTAT TGAAATTTCA TGTTTTTTTT GTTTTACTTA TTGATATGAA 1620
 TGTTTTAAAA TTTTAAACAT AGAGGACTAG GTTGATGATA TATAGTATTT AAGTTAACTA 1680
 GTCTTTGTAT AACGCAAGAT CTTGATCAAC TTATTTTTAT TTTTAATTA 1729

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 428 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2

15.4.97

5 Met Leu Gly Ser Phe Gly Ser Ser Ser Ser Gln Ser His Pro His His
 1 5 10 15
 Asp Glu Glu Ser Ser Asp His His Gln Gln Arg Arg Phe Thr Ala Thr
 20 25 30
 10 Ala Thr Thr Ile Thr Thr Thr Thr Ile Thr Thr Ser Pro Ala Ile Gln
 35 40 45
 Ile Arg Gln Leu Leu Ile Ser Cys Ala Glu Leu Ile Ser Gln Ser Asp
 50 55 60
 15 Phe Ser Ala Ala Lys Arg Leu Leu Thr Ile Leu Ser Thr Asn Ser Ser
 65 70 75 80
 Pro Phe Gly Asp Ser Thr Glu Arg Leu Val His Gln Phe Thr Arg Ala
 85 90 95
 20 Leu Ser Leu Arg Leu Asn Arg Tyr Ile Ser Ser Thr Thr Asn His Phe
 100 105 110
 Met Thr Pro Val Glu Thr Thr Pro Thr Asp Ser Ser Ser Ser Ser Ser
 115 120 125
 25 Leu Ala Leu Ile Gln Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Asn Gln Val Thr Pro
 130 135 140
 Phe Ile Arg Phe Thr Gln Leu Thr Ala Asn Gln Ala Ile Leu Glu Ala
 145 150 155 160
 30 Ile Asn Gly Asn His Gln Ala Ile His Ile Val Asp Phe Asp Ile Asn
 165 170 175
 35 His Gly Val Gln Trp Pro Pro Leu Met Gln Ala Leu Ala Asp Arg Tyr
 180 185 190
 Pro Ala Pro Thr Leu Arg Ile Thr Gly Thr Gly Asn Asp Leu Asp Thr
 195 200 205
 Leu Arg Arg Thr Gly Asp Arg Leu Ala Lys Phe Ala His Ser Leu Gly
 210 215 220
 45 Leu Arg Phe Gln Phe His Pro Leu Tyr Ile Ala Asn Asn Asn His Asp
 225 230 235 240
 His Asp Glu Asp Pro Ser Ile Ile Ser Ser Ile Val Leu Leu Pro Asp
 245 250 255
 50 Glu Thr Leu Ala Ile Asn Cys Val Phe Tyr Leu His Arg Leu Leu Lys
 260 265 270
 Asp Arg Glu Lys Leu Arg Ile Phe Leu His Arg Val Lys Ser Met Asn
 275 280 285
 55 Pro Lys Ile Val Thr Ile Ala Glu Lys Glu Ala Asn His Asn His Pro
 290 295 300
 60 Leu Phe Leu Gln Arg Phe Ile Glu Ala Leu Asp Tyr Tyr Thr Ala Val

305

310

15.04.93
315 320

Phe Asp Ser Leu Glu Ala Thr Leu Pro Pro Gly Ser Arg Glu Arg Met
325 330 335

5

Thr Val Glu Gln Val Trp Phe Gly Arg Glu Ile Val Asp Ile Val Ala
340 345 350

10

Met Glu Gly Asp Lys Arg Lys Glu Arg His Glu Arg Phe Arg Ser Trp
355 360 365

Glu Val Met Leu Arg Ser Cys Gly Phe Ser Asn Val Ala Leu Ser Pro
370 375 380

15

Phe Ala Leu Ser Gln Ala Lys Leu Leu Leu Arg Leu His Tyr Pro Ser
385 390 395 400

Glu Gly Tyr Gln Leu Gly Val Ser Ser Asn Ser Phe Phe Leu Gly Trp
405 410 415

20

Gln Asn Gln Pro Leu Phe Ser Ile Ser Ser Trp Arg
420 425

1. Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No. 1, die für die Steuerung der Seitentriebbildung
5 und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlich ist, deren Fragment oder Derivat oder eine
Nukleotidsequenz, die mit der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No. 1 hybridisiert und für die
Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlich ist.
2. Nukleotidsequenz nach Anspruch 1, wobei die hybridisierende Nukleotidsequenz unter
10 stringenten Bedingungen mit der Nukleotidsequenz gemäß SEQ ID No. 1 hybridisiert.
3. Nukleotidsequenz wie in der SEQ ID No. 1 aufgeführt.
4. Polypeptid mit einer Aminosäuresequenz wie in der SEQ ID No. 2 aufgeführt.
- 15 5. Vektor, umfassend eine Nukleotidsequenz nach einem der Ansprüche 1 bis 3.
6. Transformierte Pflanzenzelle oder transformiertes Pflanzengewebe, dadurch
gekennzeichnet, daß eine für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder
20 Abscissionszonenbildung verantwortliche exprimierbare DNA-Sequenz oder deren Fragment
oder Derivat nach Anspruch 1 oder 2 stabil in das Genom der Pflanzenzelle oder das
Pflanzengewebe integriert ist.
7. Pflanzenzelle oder Pflanzengewebe nach Anspruch 6, regenerierbar zu einer Samen-
25 produzierenden Pflanze.
8. Verfahren zur Herstellung von Pflanzen mit gesteuerter Seitentriebbildung und/oder
gesteuerter Bildung von Abscissionszonen in den Blütenstielen, umfassend das stabile
Integrieren mindestens einer für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder
30 Abscissionszonenbildung verantwortlichen exprimierbaren DNA-Sequenz oder deren Fragment
oder Derivat nach Anspruch 1 oder 2 in das Genom von Pflanzenzellen oder Pflanzengeweben
und Regeneration der erhaltenen Pflanzenzellen oder Pflanzengewebe zu Pflanzen.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei zum Integrieren eine DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat verwendet wird, die die Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung unterdrückt.

5 10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die integrierte DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat in Antisense-Orientierung zur für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlichen endogenen Sequenz exprimiert wird.

10 11. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die integrierte DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat in Sense-Orientierung zur für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlichen endogenen Sequenz exprimiert wird.

15 12. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung durch ein Ribozym, umfassend die integrierte DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat, unterdrückt wird.

20 13. Verfahren nach Anspruch 9, wobei die DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat in den genomischen Bereich des homologen endogenen Gens durch homologe Rekombination integriert wird.

14. Verfahren nach Anspruch 8, wobei zum Integrieren eine DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat verwendet wird, die die Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verstärkt.

25 15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei die integrierte DNA-Sequenz oder deren Fragment oder Derivat in Sense-Orientierung zur für die Steuerung der Seitentriebbildung und/oder Abscissionszonenbildung verantwortlichen endogenen Sequenz exprimiert wird.

30 16. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 15, wobei als Pflanze eine Tomatenpflanze oder eine Löwenmaulpflanze oder deren Zelle oder Gewebe verwendet wird.

17. Pflanze, erhältlich nach einem der Ansprüche 8 bis 16.

18. Saatgut, erhalten von Pflanzen nach Anspruch 17.

-
- ```
graph TD; A[1. Erstellung einer genetischen Karte hoher Auflösung] --> B[2. Umwandlung der genetischen Karte in eine physikalische Karte]; B --> C[3. Erstellung eines YAC- oder Cosmid-Contigs]; C --> D[4. Isolierung von Kandidaten-Genen]; D --> E[5. Komplementierung der Mutante];
```
1. Erstellung einer genetischen Karte hoher Auflösung
  2. Umwandlung der genetischen Karte in eine physikalische Karte
  3. Erstellung eines YAC- oder Cosmid-Contigs
  4. Isolierung von Kandidaten-Genen
  5. Komplementierung der Mutante

Abb. 1

1504-97

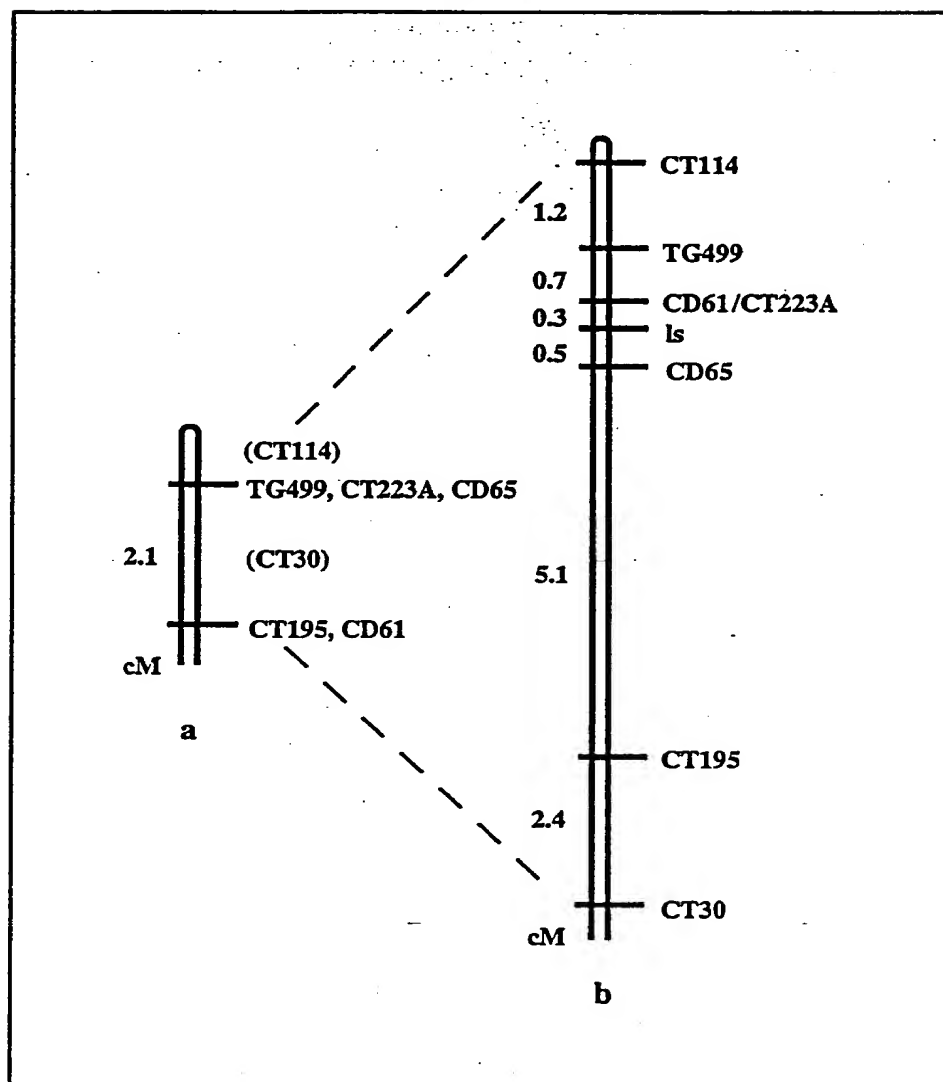


Abb. 2

15.04.97

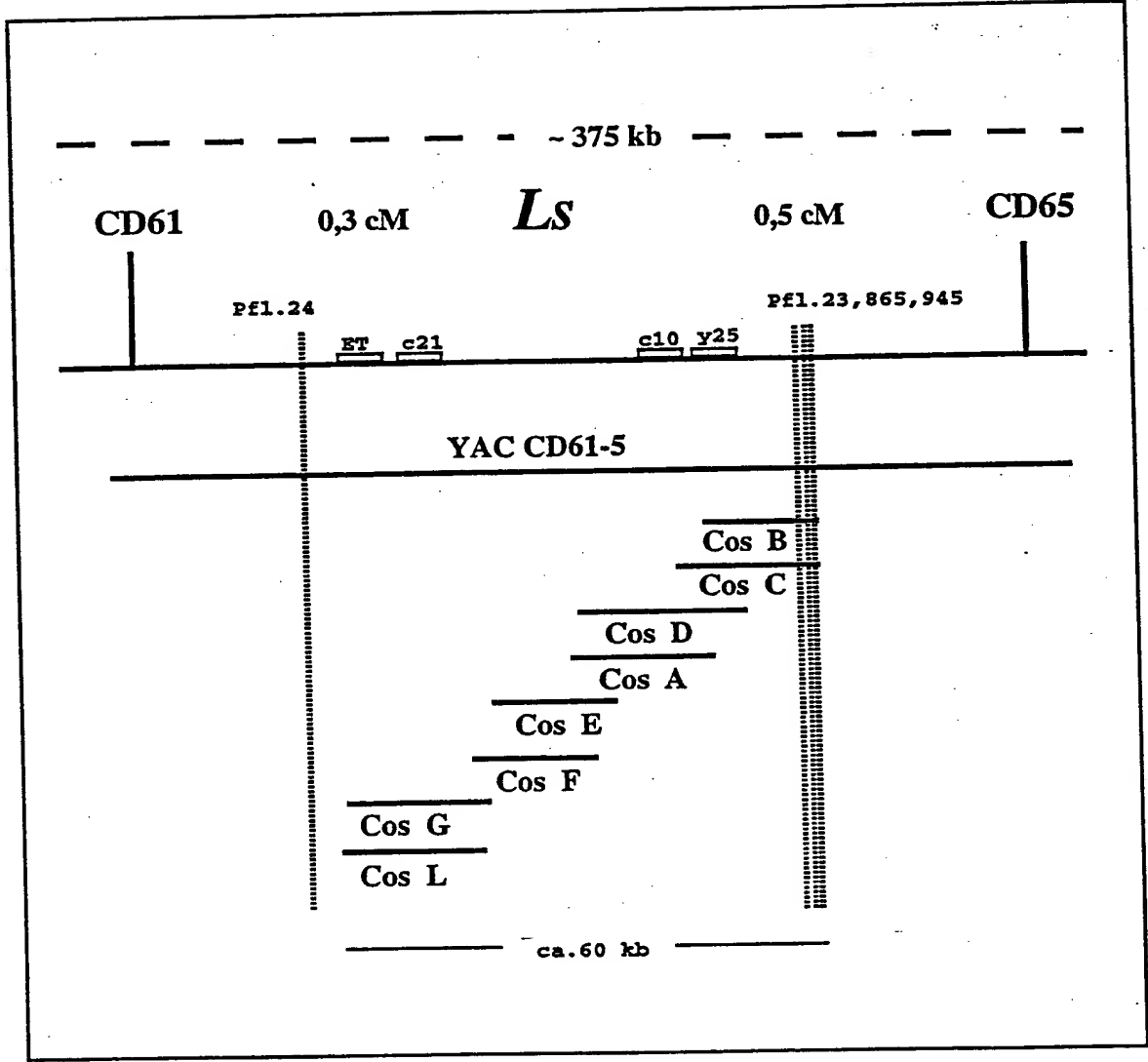


Abb. 3



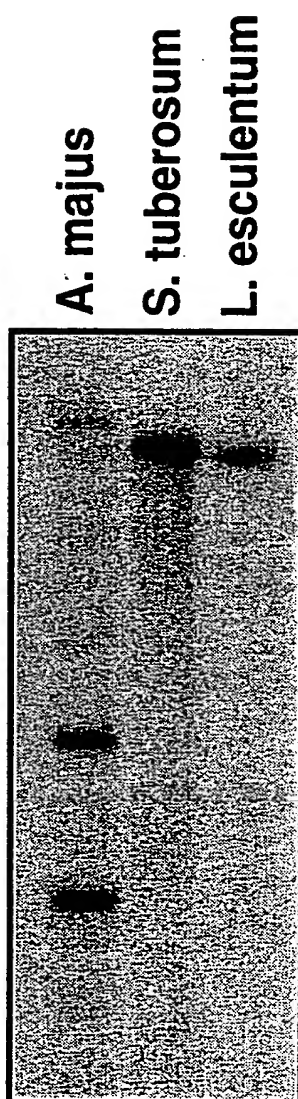


Abb. 4

|      |                                                                |      |
|------|----------------------------------------------------------------|------|
| 1    | CCTCTGTCCTTCCCCCAGGTCCCCTTTTTTTCCTTCTCTCTCTCTCTTTATTTCTCTTT    | 60   |
| 61   | TCATAAGCATATTCTTTCTCTCTCTAGGGTTTTTCACTTTACCTGAAATAGTGTGTAA     | 120  |
| 121  | ATTGAATGATATGTTAGGATCCTTTGGTTCTTCATCATCTCAATCTCACCTCATCATGA    | 180  |
|      | M L G S F G S S S S Q S H P H H D                              |      |
| 181  | TGAAGAATCTTCTGATCATCATCAACAGCGTAGATTACCGCTACTGCTACAACATATCAC   | 240  |
|      | E E S S D H H Q Q R R F T A T A T T I T                        |      |
| 241  | CACCACCACCATCACTACCTCACCAGCTATTCAAATCCGCCAGCTACTCATTAGCTGTGC   | 300  |
|      | T T T I T T S P A I Q I R Q L L I S C A                        |      |
| 301  | GGAGTTGATTTGCGAGTCCGATTTCTCGGCCGCGAAAAGACTCCTTACTATATTATCAAC   | 360  |
|      | E L I S Q S D F S A A K R L L T I L S T                        |      |
| 361  | TAATCATCTCTCTTTTGGTGATTCAACTGAACGGTTAGTCCATCAATTTACTCGCGCACT   | 420  |
|      | N S S P F G D S T E R L V H Q F T R A L                        |      |
| 421  | TTCCCTTCGTCTCAACCGCTATATATCGTCAACCACCAATCATTTTCATGACACCTGTTGA  | 480  |
|      | S L R L N R Y I S S T T N H F M T P V E                        |      |
| 481  | AACAACCTCCAACGTATTCTTCTTCTTGGTCATCATTAGCTCTAATTCATCATCATATCT   | 540  |
|      | T T P T D S S S S S S L A L I Q S S Y L                        |      |
| 541  | ATCTCTAAACCAAGTTACCCCTTTCATAAGGTTTACTCAATTAACCGCTAATCAAGCGAT   | 600  |
|      | S L N Q V T P F I R F T Q L T A N Q A I                        |      |
| 601  | TTTAGAAGCGATTAAACGGTAATCATCAAGCAATCCACATCGTTGATTTGACATTAAATCA  | 660  |
|      | L E A I N G N H Q A I H I V D F D I N H                        |      |
| 661  | CGGGGTTCAATGGCCACCGTTAATGCAAGCACTAGCTGATCGTTACCCCTGCTCCCACTCT  | 720  |
|      | G V Q W P P L M Q A L A D R Y P A P T L                        |      |
| 721  | TCGAATCACCGTACTGGAAATGACCTTGATACCCCTTCGTAGAACAGGTGATCGTTTAGC   | 780  |
|      | R I T G T G N D L D T L R R T G D R L A                        |      |
| 781  | TAAATTTGCTCACTCATTAGGGTTGAGATTTCAATCCATCCTCTTTATATAGCCAATAA    | 840  |
|      | K F A H S L G L R F Q F H P L Y I A N N                        |      |
| 841  | TAACCACGATCAGATGAAGATCCTTCTATTATTTCTCCATTGTACTACTCCCTGATGA     | 900  |
|      | N H D H D E D P S I I S S I V L L P D E                        |      |
| 901  | AACCCTAGCTATCAACTGTGTTTTCTACCTCCACCGCCTTTTAAAAGACCGCGAAAAGTT   | 960  |
|      | T L A I N C V F Y L H R L L K D R E K L                        |      |
| 961  | AAGGATTTTTTTGCATAGGGTTAAGTCAATGAACCTTAAAATTGTTACAATCGCGGAGAA   | 1020 |
|      | R I F L H R V K S M N P K I V T I A E K                        |      |
| 1021 | GGAAGCAAATCATAACCATCCTCTTTTTTTTACAAAGATTTCATCGAGGCGTTGGATTATTA | 1080 |

E A N H N H P L F L Q R F I E A L D Y Y

1081 TACAGCTGTGTTTGATTCACTGGAAGCTACATTGCCACCGGGTAGTCGAGAGAGGATGAC 1140

T A V F D S L E A T L P P G S R E R M T

1141 AGTTGAACAAGTGTGGTTTGGGAGAGAGATTGTTGATATCGTTGCGATGGAAGGAGATAA 1200

V E Q V W F G R E I V D I V A M E G D K

1201 AAGGAAAGAAAGACATGAAAGGTTTAGATCATGGGAAGTTATGTTGAGGAGTTGTGGATT 1260

R K E R H E R F R S W E V M L R S C G F

1261 TAGTAATGTTGCTTTAAGCCCTTTTGCATTATCACAAGCTAAGCTTCTTTTGAGACTTCA 1320

S N V A L S P F A L S Q A K L L L R L H

1321 TTATCCTTCTGAAGGCTATCAACTCGGAGTTTCGAGTAATTCTTTCTTTAGGTTGGCA 1380

Y P S E G Y Q L G V S S N S F F L G W Q

1381 AAATCAACCCCTTTTCTCCATCTCGTCTTGGCGTTGAGAAAACTATCAAATAGCCAACT 1440

N Q P L F S I S S W R

1441 TCAGAGGGTAATTAAGACTACTGATAGTTTAGGAGGGATCTGAAGAAAACGCGTGGAGTG 1500

1501 AAAACCCTAAATAACCAGATTTTCTAATGAAGTTGTAGTAGTAGAAATTTGCATGGTGAA 1560

1561 GAACAATATTGAAGAGGTATTGAAATTTTCATGTTTTTTTTTGTCTTATTGATATGAA 1620

1621 TGTTTTAAATTTTTTAACATAGAGGACTAGGTTGATGATATATAGTATTTAAGTTAACTA 1680

1681 GTCTTTGTATAACGCAAGATCTTGATCAACTTATTTTTATTTTTAATTA 1729

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**